

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑪ **DE 3048883 A1**

⑳ Aktenzeichen:  
㉔ Anmeldetag:  
㉕ Offenlegungstag:

P 30 48 883.6  
23. 12. 80  
15. 7. 82

⑤① Int. Cl. 3:  
**C08F2/22**  
C 08 F 20/32  
C 12 Q 1/00  
C 12 N 11/08  
C 07 G 7/00  
G 01 N 33/54

⑦① Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE;  
Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften,  
11142 Praha, CS

⑦④ Vertreter:

Grußdorf, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Daum, M., Dr.-Ing.,  
Pat.-Ass., 6800 Mannheim

⑦② Erfinder:

Batz, Hans-Georg, Dr.rer.nat., 8132 Tutzing, DE; Tanswell,  
Paul, Dr.phil., 8033 Planegg, DE; Baier, Manfred, Dr.rer.nat.,  
8134 Pöcking, DE; Bouchal, Karel, Dr.-Ing., 150 00 Prag, CS;  
Kalal, Jaroslav, Prof. Dr.-Ing., 160 00 Prag, CS; Svec,  
Frantisek, Dr.-Ing., 273 43 Hrebek, CS; Zurkova, geb. Hrubá,  
Eva, 147 00 Praha, CS; Kalal, Jaroslav, Prof. Dr.Ing., 160 00  
Praha, CS; Svec, Frantisek, Dr.-Ing., 273 43 Hrebek, CS;  
Zurkova, geb. Hrubá, Eva, Dr.-Ing., 147 00 Praha, CS

⑤④ **Hydrophile Latexpartikel, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung**

DE 3048883 A1

BEST AVAILABLE COPY

DE 3048883 A1

~~23.12.80~~Patentansprüche

- 1 1. Aus einem Homo- oder Copolymerisat von in Wasser schwerlöslichen Monomeren bestehende hydrophile Latexpartikel, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Emulsionspolymerisation in Anwesenheit eines wasserlöslichen, Radikale bildenden Initiators, jedoch ohne  
5 jeden Zusatz eines Emulgators, Stabilisators oder Netzmittels herstellbar sind.
2. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer (im Falle eines  
10 Homopolymerisats) bzw. ein Teil der Monomeren (im Falle eines Copolymerisats) ein mindestens eine polymerisierbare C=C -Doppelbindung im Molekül enthaltendes Epoxid ist.
- 
- 15 3. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer bzw. ein Teil der Monomeren eine Epoxy-alkylen-Verbindung bzw. ein Glycidylester oder Glycidyläther ist.
- 20 4. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer bzw. ein Teil der Monomeren Glycidylacrylat oder Glycidylmethacrylat ist.

20 10 00  
- 2 -

- 1 5. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche  
1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Homo- oder  
Copolymerisat mit Hilfe eines zwei- oder mehrfach unge-  
sättigten Vernetzungsmittels vernetzt ist.
- 5 6. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche  
1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen  
monodisperse Kügelchen sind und einen untereinander  
nahezu gleich großen Durchmesser von zwischen 0,15  
10 und 1,5  $\mu\text{m}$  besitzen.
- 15 7. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche  
1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Homo- oder  
Copolymerisat endständige Hydroxyl-, primäre oder sekun-  
däre Amino-, Thiol-, Aldehyd- oder Carboxylgruppen  
aufweist.
- 20 8. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche  
1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie einpoly-  
merisierte Farbstoffe oder fluoreszierende Verbin-  
dungen enthalten.
- 25 9. Verfahren zur Herstellung der hydrophilen Latex-  
partikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch  
gekennzeichnet, daß ein in Wasser schwerlösliches  
Monomer oder verschiedene in Wasser schwerlösliche  
Monomere in Wasser dispergiert und unter Ausschluß  
von Sauerstoff, beispielsweise in einer Inertgas-  
atmosphäre, durch Emulsionspolymerisation in Anwe-  
senheit eines wasserlöslichen, Radikale bildenden  
30 Initiators, jedoch ohne jeden Zusatz eines Emulga-  
tors, Stabilisators oder Netzmittels homo- oder  
copolymerisiert werden.
- 35

ORIGINAL INSPECTED

25 3 10 10 10

- 1 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,  
daß ein mindestens eine (co)polymerisierbare  
5 C = C -Doppelbindung im Molekül enthaltendes Epoxid,  
gegebenenfalls im Gemisch mit anderen copolymerisier-  
baren Monomeren, in Wasser dispergiert und durch  
Emulsionspolymerisation ohne Zusatz eines Emulga-  
tors homo- oder copolymerisiert wird.
- 10 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als  
Epoxid eine Epoxy-alkylen-Verbindung bzw. ein Glycidylester  
oder Glycidyläther verwendet wird.
- 15 12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß als Epoxid Glycidylacrylat oder  
Glycidylmethacrylat verwendet wird.
- 20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch  
gekennzeichnet, daß die Emulsionspolymerisation  
unter Zusatz eines zwei- oder mehrfach ungesättigten  
Vernetzungsmittels durchgeführt wird.
- 25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch  
gekennzeichnet, daß bei der Emulsionspolymerisation  
das Flottenverhältnis (Wasser : Monomerenphase)  
8 : 1 bis 16 : 1, bezogen auf die Volumina, beträgt.
- 30 ~~15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14, dadurch  
gekennzeichnet, daß die Initiatorkonzentration in  
der wäßrigen Phase 0,5 bis 1,5 g/l beträgt.~~
- 35 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch  
gekennzeichnet, daß die Konzentration des Epoxids  
in der Monomerenphase 1 bis 100 Gew.% beträgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 16, dadurch  
gekennzeichnet, daß die Emulsionspolymerisation  
bei einer Temperatur von zwischen 0° und 80°C durch-  
geführt wird.

26 20.10.80  
4.

- 1 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der endständige Epoxid-Gruppen  
5 enthaltende Latex noch während oder nach der Emul-  
sionspolymerisation mit wäßriger Alkalihydroxid-  
lösung, wäßriger Ammoniaklösung, mit einem primären  
Amin, einem Hydrazin oder einem Sulfid, einer Hydrolyse,  
Ammonolyse, Aminolyse oder Thiolyse unterworfen wird,  
10 so daß sich endständige Hydroxyl-, gegebenenfalls  
mono- oder disubstituierte Aminogruppen oder Thiol-  
gruppen bilden, welche gegebenenfalls anschließend  
enzymatisch oder mit Periodat bzw. Periodsäure in  
Aldehydgruppen übergeführt werden.
- 15 19. Diagnostisches Mittel, enthaltend hydrophile Latex-  
partikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 als  
Träger und an diesen Träger direkt oder über ein  
Kupplungsmittel als "Brücke" kovalent gebundene  
biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen.
- 20 20. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 19, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß es als biologisch und/oder immuno-  
logisch aktive Substanzen Peptide, Proteine, Enzyme,  
Hormone, Vitamine, Antigene, Antikörper oder Mikro-  
organismen enthält.
- 25 21. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 20 zur Bestimmung  
von Thyroxin, dadurch gekennzeichnet, daß es als  
biologisch und/oder immunologisch aktive Substanz  
einen Thyroxin-Antikörper enthält.
- 30 22. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 20 zur Bestimmung  
von Human-Thyreotropin, dadurch gekennzeichnet, daß  
es als biologisch und/oder immunologisch aktive Sub-  
stanz einen Human-Thyreotropin-Antikörper enthält.

23.12.80

5.

2350

Tschechoslowakische Akademie der Wissen-  
schaften

Narodni 3, 111 42 Prag

Boehringer Mannheim GmbH

Sandhofer Straße 116, 6800 Mannheim 31

---

Hydrophile Latexpartikel, Verfahren zu deren  
Herstellung und deren Verwendung

---

Die Erfindung betrifft hydrophile Latexpartikel, ein Ver-  
fahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Trä-  
germaterial für biologisch und/oder immunologisch aktive  
Substanzen in diagnostischen Mitteln.

5

10

Für die Agglutination von Antigen-Antikörper-Komplexen,  
die in der Immunologie im Rahmen vieler diagnostischer  
Bestimmungen ausgenutzt wird, weil sie besonders schnell  
und einfach durchgeführt und häufig mit bloßem Auge beob-  
achtet werden kann, verwendet man seit langem hydrophobe  
Latexpartikel als Träger von immunologisch aktiven Substan-  
zen, beispielsweise von Antikörpern. Diese hydrophoben  
Latexpartikel bestehen meist aus Polystyrolhomo- oder  
Copolymerisaten, beispielsweise Styrol-Butadien-Copolymeri-



26

- 1 saten oder Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymerisaten (ABS) und werden durch Emulsionspolymerisation hergestellt.
- 5 Bei der seit langem bekannten Emulsionspolymerisation sind im allgemeinen vier Komponenten zugegen: ein in Wasser schwerlösliches Monomer oder ein Gemisch verschiedener in Wasser schwerlöslicher Monomere, Wasser, ein Emulgator und ein wasserlöslicher Initiator. Das
- 10 Monomere wird dabei durch den Emulgator in Form feiner Tröpfchen emulgiert, wobei sich durch Zusammenlagerung von mehreren Emulgatormolekülen u.a. größere Micellen bilden, die teilweise leer und teilweise mit Monomermolekülen gefüllt sind; letzteres wird als "Solubilisierung"
- 15 des Monomeren bezeichnet. Der wasserlösliche Initiator bildet Radikale, die die Polymerisation sowohl von einzelnen Monomermolekülen in der Wasserphase als auch in den monomergefüllten Micellen sowie in den Monomertröpfchen auslösen bzw. aktivieren können. Tatsächlich findet
- 20 aber die Polymerisation überwiegend in den gequollenen Micellen statt, da einerseits die Monomerkonzentration in den Micellen wesentlich größer ist als in der Umgebung einzelner gelöster Monomermoleküle und andererseits die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung von Micellen wegen
- 25 ihrer im Vergleich zur Zahl der Monomertröpfchen wesentlich größeren Anzahl beträchtlich höher ist. Der Durchmesser der gefüllten Micellen nimmt während der Polymerisation zu, bis diese schließlich in kugelförmige Latexteilchen übergehen. Die Emulgatormoleküle der nichtaktivierten Micellen und diejenigen aus der Oberfläche der
- 30 verbrauchten Monomertröpfchen bedecken die Oberfläche der Latexteilchen und tragen so zur Stabilisierung der entstehenden Polymerdispersion bei.
- 35 Diese nach dem bekannten Verfahren unter Zusatz eines Emulgators oder Emulsionsstabilisators, welcher beispielsweise ein Tensid oder Netzmittel sein kann, hergestellten Latices haben folgende Nachteile, die insbesondere ihre

ORIGINAL INSPECTED

23.12.80  
3.7.

- 1 Verwendung als Träger von immunologisch aktiven Substanzen stören und ihren Einsatz in kontinuierlichen Lösungsmesssystemen verhindern:
- 5 1. An der hydrophoben Oberfläche der Latexpartikel werden neben den gewünschten immunologisch aktiven Substanzen, beispielsweise Antikörpern, unspezifisch eine Vielzahl anderer Serumbestandteile gebunden;
- 10 2. die nur adsorptiv, nicht kovalent gebundenen immunologisch aktiven Substanzen können sich während der Messung im Verlauf eines diagnostischen Tests wieder ablösen;
- 15 3. die bei der Emulsionspolymerisation als Emulgator oder Stabilisator verwendeten Tenside können die Struktur und damit die Aktivität der biologisch aktiven Proteine zerstören, weil sie in die wässrige Lösung diffundieren;
- 20 4. beim Entfernen der sie stabilisierenden Tenside koaguliert die Latexsuspension und auch beim Zentrifugieren wird die Stabilisierung gebrochen. Der hierbei entstehende Niederschlag kann nur schwer oder überhaupt nicht mehr zum vorherigen Zustand resuspendiert werden.
- 25
- 
- Zur Vermeidung dieser Nachteile wurden bereits verschiedene Vorschläge gemacht, die aber immer nur einen Teil der vorstehend genannten Probleme lösen konnten:
- 30 So sind aus der DE-AS 22 03 377 hydrophobe Latexpartikel mit einer Teilchengröße von 0,01 bis 0,9  $\mu\text{m}$  aus carboxylierten ABS-Copolymeren und carboxylierten Styrol-Butadien-Copolymeren bekannt, die als serologisch inerte Träger für biologisch aktive Proteine verwendet werden
- 35 können, wobei die Proteine kovalent an den Träger gebunden werden, und zwar über die in den Latex eingeführten Carboxylgruppen, unter Ausbildung von Amidbindungen.



20.000  
4.8.

- 1 Aus der DE-OS 28 12 845 sind hydrophobe Latices mit einer  
Teilchengröße von 0,05 bis 1  $\mu$ m aus ABS-Copolymeren be-  
kannt, bei denen der Latex ebenfalls mit Carboxylgruppen  
5 modifiziert und mit einer reaktiven Seitenkette konden-  
siert ist, so daß immunologisch aktive Substanzen eben-  
falls kovalent gebunden werden können.

Mit diesen bekannten hydrophoben Latices wird zwar das  
Problem Nr. 2 (s.o.) gelöst, alle übrigen Nachteile  
10 bleiben aber unverändert bestehen.

- Man hat deshalb auch schon versucht, anstelle hydrophober  
Latices hydrophile Gele als Träger für immunologisch  
aktive Substanzen zu verwenden. Da hydrophile Gele keine  
15 oder nur sehr geringe Adsorptionseigenschaften haben,  
andererseits aber die kovalente Bindung von Proteinen  
an solche Gele bekannt ist, hat man "Mikrogele" vorge-  
schlagen, die aufgrund ihrer Herstellungsweise und ihres  
Teilchendurchmessers ebenso gut als "Latices" bezeichnet  
20 werden könnten. Solche hydrophilen Latices sind beispiels-  
weise aus der US-PS 4 138 383 bekannt. Sie bestehen aus  
kugelförmigen Teilchen mit einem Durchmesser von weniger  
als 0,35  $\mu$ m, die unter den Bedingungen einer durch freie  
Radikale initiierten wäßrigen Emulsionspolymerisation  
25 hergestellt werden, wobei als Monomere Acrylamide, Acryl-  
säure, Methacrylsäure oder Acrylate verwendet werden.  
Als Emulgatoren werden beispielsweise Metallseifen ver-  
wendet. An die so erhaltenen hydrophilen Mikrogele werden  
biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen in an  
30 sich bekannter Weise über Carbodiimid- oder Glutaraldehyd-  
Brücken kovalent gebunden. Damit sind zwar die Probleme  
Nr. 1 und 2 (s.o.) gelöst worden, nicht aber die Probleme  
Nr. 3 und 4, da die Emulsionspolymerisation nach wie vor  
unter Zusatz eines Emulgators oder Stabilisators durch-  
35 geführt werden muß.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, hydrophile  
Latexpartikel, ein Verfahren zu deren Herstellung und

ORIGINAL INSPECTED

23.12.80  
5/9.

- 1 ein diese enthaltendes diagnostisches Mittel zu schaffen,  
mit denen es gelingt, alle vier oben genannten Nachteile  
zu vermeiden. Der Erfindung liegt also insbesondere die  
Aufgabe zugrunde, hydrophile Latexpartikel zu schaffen,  
5 die in der Lage sind, biologisch und/oder immunologisch  
aktive Substanzen kovalent zu binden, die die Struktur  
und damit die Aktivität der biologisch aktiven Proteine  
nicht beeinträchtigen, deren Stabilisierung beim Zentri-  
fugieren nicht gebrochen wird und die sich koagulieren  
10 und anschließend wieder leicht resuspendieren lassen.

Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch aus einem  
Homo- oder Copolymerisat von in Wasser schwerlöslichen  
Monomeren bestehende hydrophile Latexpartikel gelöst, die  
15 dadurch gekennzeichnet sind, daß sie durch Emulsionspoly-  
merisation in Anwesenheit eines wasserlöslichen, Radikale  
bildenden Initiators, jedoch ohne jeden Zusatz eines  
Emulgators, Stabilisators oder Netzmittels herstellbar  
sind.

- 20 Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung be-  
steht mindestens ein Teil der Monomeren, aus denen die  
hydrophilen Latexpartikel aufgebaut sind, aus einem  
mindestens eine polymerisierbare C=C -Doppelbindung im  
25 Molekül enthaltenden Epoxid.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß entgegen der  
in Fachkreisen seit langem herrschenden Meinung, die auch  
in dem eingangs zitierten Stand der Technik zum Ausdruck  
30 gebracht wird, der Zusatz eines Emulgators, Stabilisators  
oder eines Netzmittels zur Durchführung der Emulsions-  
polymerisation gar nicht erforderlich ist. Damit entfällt  
aber die meist sehr schwierige und umständliche Entfernung  
von Emulgatorresten aus den polymeren Latexpartikeln, die  
35 bisher zwingend erforderlich war, weil die als Emulgatoren  
verwendeten Metallseifen oder Tenside aus den Latexparti-  
keln diffundierten und die biologische Aktivität der an  
die Latexpartikel kovalent gebundenen Proteine beein-  
trächtigten oder vollkommen zerstörten.

1 Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung von  
mindestens eine polymerisierbare Doppelbindung enthalten-  
den Glycidyl-Verbindungen als Monomer erwiesen. Die  
Struktur dieser Verbindungen weist in der polymerisier-  
5 baren Doppelbindung einen hydrophoben und in der Epoxid-  
Gruppe, dem Oxiran-Ring, zugleich einen hydrophilen Teil  
auf. Die erfindungsgemäß entstehenden Latexsuspensionen  
koagulieren nicht trotz Abwesenheit jeglichen Emulgators,  
Stabilisators oder Netzmittels. Die Stabilisierung der  
10 Latexsuspension wird auch beim Zentrifugieren nicht ge-  
brochen. Da die endständigen Epoxidgruppen für verschie-  
dene Umsetzungen (Hydrolyse, Ammonolyse, Aminolyse, Kon-  
densationen) sehr leicht zugänglich sind, müssen die  
Epoxidgruppen die Oberfläche der monodispers verteilten  
15 Latexkügelchen so bedecken, daß sie in die Wasserphase  
hinaus orientiert sind.

Als Monomere werden erfindungsgemäß vorzugsweise Glycidyl-  
methacrylat, Glycidylacrylat, Glycidylvinyläther, Glyci-  
20 dylvinylphthalat und 3,4-Epoxybut(1)en verwendet. Es kann  
dabei ausschließlich eines dieser Monomere verwendet  
werden, so daß die entstehenden hydrophilen Latexpartikel  
ein Homopolymerisat darstellen, es kann aber auch ein  
Gemisch dieser Monomere copolymerisiert werden.

25 Zur Steuerung des Gehaltes an Epoxidgruppen können mit  
einer oder mehreren der genannten Glycidylverbindungen  
auch andere Monomere copolymerisiert werden, beispiels-  
weise Styrol, Diene, Acrylamide, Methacrylamide, Alkyl-,  
30 Hydroxyalkyl- und Aminoalkylacrylate, Alkyl-, Hydroxy-  
alkyl- und Aminoalkylmethacrylate, Vinyläther, Vinylester,  
N-Vinylpyrrolidon und dergleichen.

Es kann auch in Gegenwart monomerer, polymerisierbarer  
35 Derivate von Farbstoffen oder fluoreszierenden Verbindungen,  
z.B. Fluorescein, polymerisiert werden. Auf diese Weise  
werden farbige bzw. fluoreszierende Latexpartikel erhalten,  
die sich zum Nachweis von Antigenen bzw. Antikörpern in  
menschlichen oder tierischen Geweben eignen. Diese Nachweis-

ORIGINAL INSPECTED

- 1 methode eignet sich: besonders vorteilhaft zur Herstellung  
von Gewebeschnitten in der Histologie. Als monomere, poly-  
merisierbare Derivate werden vorzugsweise Farbstoffe bzw.  
fluoreszierende Verbindungen eingesetzt, in die in an sich  
5 bekannter Weise Methacryl- bzw. Acryl-Reste eingebaut  
worden sind.

- Um die Schwerlöslichkeit der entstehenden Latexpartikel  
in Wasser zu erhöhen, können während der Emulsionspoly-  
10 merisation übliche Vernetzungsmittel zugesetzt werden,  
beispielsweise Alkylen- oder Hydroxyalkylendiacylate,  
Alkylen- oder Hydroxyalkylen dimethacrylate, Alkylenbis-  
acrylamide oder Alkylenbisacrylmethacrylamide, Divinyl-  
benzol und dergleichen.

- 15 Als Initiator kann jeder üblicherweise für die Emulsions-  
polymerisation verwendete wasserlösliche Initiator ver-  
wendet werden; erfindungsgemäß werden vorzugsweise  
Peroxodisulfate, Peroxoborate, Wasserstoffperoxid oder  
20 geeignete Redoxsysteme eingesetzt.

- Das erfindungsgemäße Verfahren der emulgatorfreien Emul-  
sionspolymerisation von einem oder verschiedenen in  
Wasser schwerlöslichen Monomeren zur Herstellung der  
25 hydrophilen Latexpartikel ist gegenüber Luftsauerstoff  
bzw. freiem Sauerstoff überhaupt empfindlich. Der Sauer-  
stoff muß deshalb sehr sorgfältig aus allen Polymerisa-  
tionskomponenten und Gefäßen durch gründliches Auskochen,  
durch Destillation unter Inertgasatmosphäre oder durch  
30 Hindurchleiten von Stickstoff, Argon oder einem anderen  
Inertgas entfernt werden.

- Die emulgatorfreie Emulsionspolymerisation wird erfin-  
dungsgemäß vorzugsweise mit einem Flottenverhältnis,  
35 bezogen auf die Volumina, zwischen Wasser- und Monomeren-  
phase von 8 : 1 bis 16 : 1 durchgeführt.

Die Konzentration des in der wäßrigen Phase gelösten  
Initiators beträgt vorzugsweise zwischen 0,5 und 1,5 g/l



- 1 und die Konzentration des Epoxids in der Monomerenphase beträgt vorzugsweise 1 bis 100 Gew.-%.

5 Die Emulsionspolymerisation wird vorzugsweise bei einer Temperatur von 0 bis 80°C durchgeführt. Die Temperatur ist abhängig vom gewählten Initiator: bei Verwendung von Kaliumperoxodisulfat arbeitet man vorzugsweise bei 60 bis 70°C. Ebenfalls abhängig von der Wahl des Initiators ist die Reaktionsdauer, die zwischen 5 und 40 Stunden  
10 beträgt.

Die erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel sind streng kugelförmige, monodispers verteilte und untereinander annähernd gleich große Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 0,15 bis 1,5 µm.  
15

Die hydrophilen Latexpartikel können nach beendeter Emulsionspolymerisation noch Reste nichtauspolymerisierter Monomere enthalten, die durch Wasserdampfdestillation  
20 oder Dialyse beseitigt werden können. Auch hierbei kommt die besonders vorteilhafte Eigenschaft der erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel zum Tragen, die darin besteht, daß die Latexpartikel durch Zentrifugieren sedimentiert werden können, ohne daß die Stabilisierung  
25 gebrochen wird, so daß sie anschließend wieder redispersiert werden können. Auf diese Weise kann der erfindungsgemäße Latex durch mehrfaches Zentrifugieren und Dekantieren auf einfache Weise gereinigt werden.

30 Die endständigen freien Epoxidgruppen des erfindungsgemäßen Latex sind gegenüber den unterschiedlichsten chemischen Substanzen hoch reaktionsfähig und können deshalb leicht hydrolysiert, mit Periodat oder Periodsäure zur Aldehydgruppe oxidiert, mit Ammoniak, primären Aminen,  
35 Diaminen oder Hydrazinen zu prim. od. sek. Aminogruppen umgesetzt oder mit Hilfe anderer bekannter Reaktionen modifiziert werden. Die Emulsion des erfindungsgemäßen Latex weist trotz Fehlens eines Emulgators eine derart hohe Stabilität auf, daß die Modifizierung der Epoxidgruppen

BAD ORIGINAL

1 gewünschtenfalls auch schon während der Emulsionspolymeri-  
sation durchgeführt werden kann, so daß bereits aus der  
Polymerisationsreaktion ein Latex entsteht, der an der  
Oberfläche beispielsweise mit primären Aminogruppen  
5 modifiziert ist. Die modifizierten oder derivatisierten  
Epoxidgruppen stehen dann für die "Kupplung" mit biolo-  
gisch und/oder immunologisch aktiven Proteinen, die somit  
kovalent an die als Träger fungierenden hydrophilen Latex-  
partikel gebunden werden, zur Verfügung.

10.

Die eingangs genannte Aufgabe wird somit weiter durch die  
Verwendung der erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel  
als serologisch inerte Träger für biologisch und/oder  
immunologisch aktive Substanzen gelöst, beispielsweise  
15 als Träger für Peptide, Proteine, Enzyme, Hormone, Vita-  
mine, Antigene, Antikörper und Mikroorganismen.

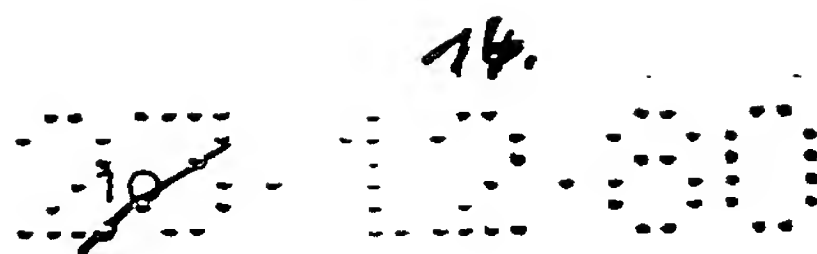
Gegenstand der Erfindung ist somit weiterhin ein diagno-  
stisches Mittel, enthaltend erfindungsgemäße hydrophile  
20 Latexpartikel als Träger und an diesen Träger direkt oder  
über ein Kupplungsmittel als "Brücke" kovalent gebundene  
biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen der  
vorstehend genannten Art.

25 Die erfindungsgemäßen diagnostischen Mittel eignen sich  
besonders zum Einsatz in Radioimmuno-(RIA), Enzymimmuno-  
(EIA) und sogenannten ELISA(enzymelinked immunosorbent  
assay)-Tests.

30

35





# 1 Beispiel 1

In 80 ml destilliertem Wasser werden 0,08 g Kaliumperoxo-  
disulfat ( $K_2S_2O_8$ ) gelöst und dadurch von Luftsauerstoff  
5 befreit, daß 30 Minuten lang Stickstoff hindurchgeleitet  
wird. Gleichzeitig werden 10 ml Glycidylmethacrylat auf  
dieselbe Weise von Luftsauerstoff befreit. Beide Kompo-  
nenten werden in einen Glasreaktor verbracht und weitere  
10 Minuten lang mit Stickstoff behandelt. Danach wird  
der Reaktor geschlossen und die Reaktion unter ständigem  
Rühren 6 Stunden lang bei einer Temperatur von  $65^{\circ}C$  durch-  
geführt. Nach dieser Zeit beträgt der Umsatz 98%. Das  
Reaktionsprodukt ist ein Latex aus kugelförmigen, mono-  
dispers verteilten Polyglycidylmethacrylat-Partikeln mit  
15 einem Durchmesser von 0,44  $\mu m$ .

## Beispiel 2

Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden 160 ml destillier-  
20 tes Wasser, in dem 0,08 g  $K_2S_2O_8$  gelöst sind, und 10 ml  
eines Gemischs aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und  
85 Gew.% Styrol getrennt vom Sauerstoff befreit und 6  
Stunden lang unter ständigem Rühren bei einer Temperatur  
von  $65^{\circ}C$  miteinander umgesetzt. Danach beträgt der Umsatz  
25 71,6%. Die nichtauspolymerisierten Restmonomeren werden  
durch Wasserdampfdestillation beseitigt. Die entstehenden  
monodispersen copolymeren Latexpartikel haben einen Durch-  
messer von 0,22  $\mu m$ .

## 30 Beispiel 3

Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden eine Lösung von  
0,1 g  $K_2S_2O_8$  in 100 ml destilliertem Wasser und 10 ml  
eines Gemischs aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und 85 Gew.%  
35 Vinylacetat miteinander umgesetzt. Der Umsatz beträgt  
80%. Die Restmonomeren werden durch Wasserdampfdestilla-  
tion entfernt. Der entstehende Latex besteht aus mono-  
dispersen, kugelförmigen Teilchen mit einem Durchmesser

1 von 0,16  $\mu\text{m}$ .

100 ml des so hergestellten Latex werden mit 100 ml  
0,1 M-NaOH-Lösung vermischt und bei einer Temperatur von  
5 etwa 25°C 24 Stunden stehengelassen. Auch während und  
nach der Hydrolyse bleibt die Stabilität des Latex er-  
halten. Die Emulsion wird zentrifugiert, der Überstand  
abgegossen und die feste Phase wieder in Wasser redisper-  
giert. Das Zentrifugieren und Redispergieren wird zweimal  
10 wiederholt. Die entstehende neutrale Emulsion wird mit  
1 M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf einen pH-Wert von 3 gebracht und mit Period-  
säure in einer den Epoxidgruppen äquivalenten Menge ver-  
setzt. Die Oxidation wird bei 25°C etwa 24 Stunden lang  
durchgeführt; anschließend werden die nichtumgesetzten  
15 niedermolekularen Stoffe durch Dialyse entfernt. Die  
modifizierten Latexpartikel der stabilen Emulsion ent-  
halten 2,8 Gew.% oder 0,97 mMol/g an Aldehydgruppen.

#### Beispiel 4

20

Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden eine Lösung von  
0,1 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> in 100 ml destilliertem Wasser und 10 ml  
eines Gemischs aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und  
85 Gew.% Isopren bei einer Temperatur von 65°C 24 Stunden  
25 lang umgesetzt. Der Umsatz beträgt 76%. Die Restmonomeren  
werden anschließend durch Wasserdampfdestillation entfernt,  
wobei stabile, monodispers verteilte kugelförmige Latex-  
partikel mit einem Durchmesser von 0,25  $\mu\text{m}$  entstehen.

30

100 ml dieser Emulsion werden anschließend mit 100 ml  
wäßriger Ammoniaklösung (25%ig) versetzt und 24 Stunden  
lang bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei die  
Epoxidgruppen durch Ammonolyse in Aminogruppen übergehen.  
Das Reaktionsprodukt wird anschließend mit Periodsäure  
35 behandelt, wobei ein Latex entsteht, der 4,5 Gew.% oder  
1,55 mMol/g an Aldehydgruppen enthält.

16.

10

## Beispiel 6

20

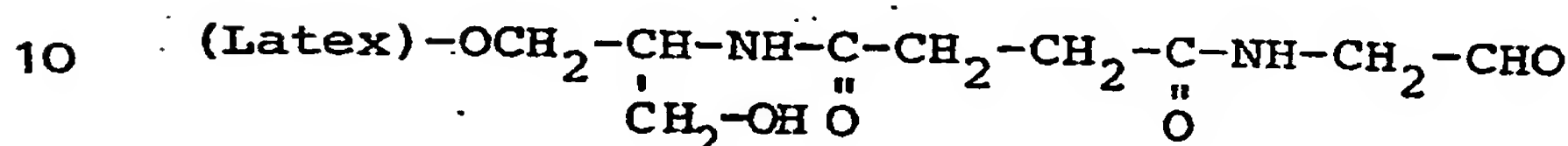
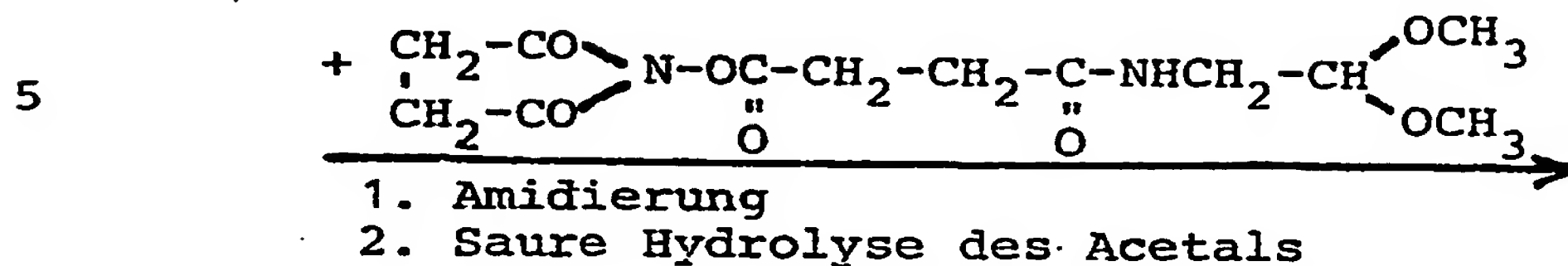
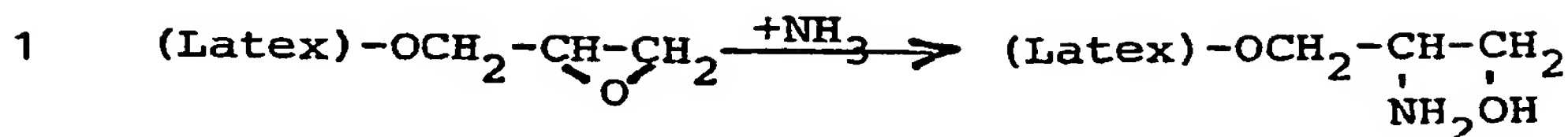
## Beispiel 7



30

13. 12. 80

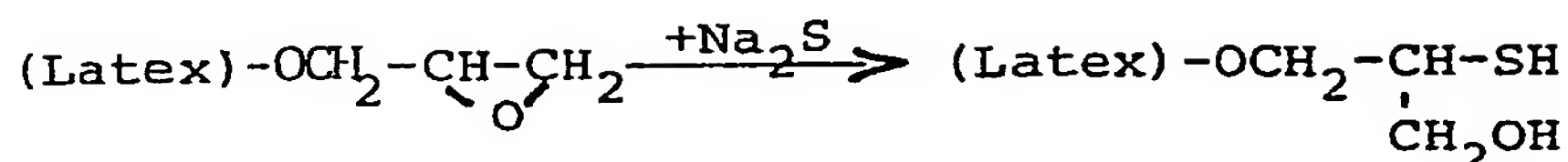
17.

Beispiel 8

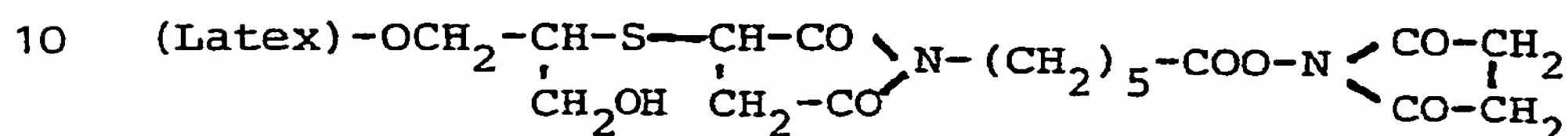
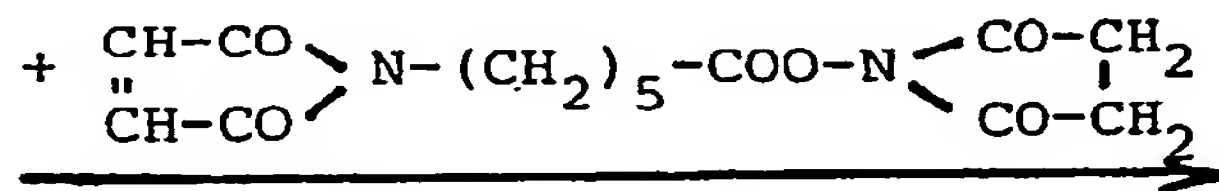
- 20 ml einer nach Beispiel 1 hergestellten Latex-Suspension werden mit 10 ml konzentrierter Ammoniak-Lösung 20 Std. bei Raumtemperatur gerührt und 48 Std. gegen fließendes Wasser dialysiert. Die erhaltene Suspension wird abzentrifugiert. Der Stickstoff-Gehalt der Trockensubstanz liegt danach bei etwa 1 %, was einer Aminierung von etwa jeder 10. Epoxid-Einheit entspricht, bei einer bevorzugten Reaktion an der Oberfläche aber sicher einem höheren Derivatisierungsgrad entspricht. Die abzentrifugierte Festsubstanz wird mit 20 ml 0,1 N Natronlauge wieder aufgenommen. Dazu werden unter Rühren 1,5 g Bernsteinsäurehydroxysuccinimid-ester-amidoacetaldehyd-acetal (gelöst in 6 ml Dimethylformamid) getropft. Die entstehende Suspension wird noch 3 Std. gerührt, danach mit 1N Salzsäure auf pH 3 gebracht und dann 12 Std. gegen fließendes dest. Wasser dialysiert.

14. 12. 80  
18.

1 Beispiel 9



5



20 ml einer nach Beispiel 1 hergestellten Latex-Suspension  
 15 werden mit 0,5 g  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  versetzt und 2 Tage bei Raum-  
 temperatur gerührt. Anschließend wird gegen fließendes  
 dest. Wasser dialysiert, bis die Suspension geruchsfrei  
 ist, dann wird die Suspension abzentrifugiert. Die Trocken-  
 substanz enthält etwa 2 % Schwefel, was einer Derivatisierung  
 20 etwa jeder 10. Epoxid-Einheit entspricht, bei einer bevor-  
 zugten Reaktion an der Oberfläche aber sicher einem höheren  
 Derivatisierungsgrad entspricht.  
 Das abzentrifugierte Produkt wird mit 1 g 6-Maleinimido-  
 hexansäure-hydroxysuccinimidester (gelöst in 6 ml Dimethyl-  
 25 formamid) versetzt, 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt  
 und dann 12 Std. gegen fließendes dest. Wasser dialysiert.

Beispiel 10

30

Bildung von Latex-gamma-Globulin-Konjugaten

1 ml gamma-Globulin-Lösung (enthaltend 56,6 mg Protein)  
 werden mit jeweils 20 ml einer

35

3:15, 10:00  
15, 19,

- 1 a) nach Beispiel 1 hergestellten,  
b) nach Beispiel 7,  
c) nach Beispiel 8 und  
5 d) nach Beispiel 9 derivatisierten

5 Latex-Suspension versetzt und 12 Std. bei Raumtemperatur  
dialysiert. Die verbleibenden Suspensionen werden abzen-  
trifugiert. Anschließend wird im Überstand freies Protein  
bestimmt. Aus dem gefundenen Wert läßt sich der an die  
10 Latex-Teilchen gebundene Anteil berechnen. Danach enthält:

Ansatz a	8 mg gamma-Globulin, gebunden
Ansatz b	43 mg gamma-Globulin, gebunden
Ansatz c	15 mg gamma-Globulin, gebunden
15 Ansatz d	19 mg gamma-Globulin, gebunden

#### Beispiel 11

##### Bildung von Latex-IgG-Konjugaten

20 Wie in Beispiel 10 beschrieben werden aus einer IgG-Lösung  
und verschiedenen Latex-Suspensionen Latex-IgG-Konjugate  
hergestellt. Durch Antikörper-Komplexbildung wird die  
Beladung der Latex-Partikel mit IgG-Molekülen nachgewiesen.

25 Im folgenden werden zwei diagnostische Mittel als  
Beispiele für die Verwendung der erfindungsgemäßen hydro-  
philen Latexpartikel beschrieben, und zwar zur immuno-  
logischen Bestimmung von Thyroxin ( $T_4$ ) mit Hilfe von  $T_4$ -  
30 Antikörpern aus Anti- $T_4$ -Serum vom Schaf und zur Bestimmung  
von Humanthyr(e)otropin (TSH) im Serum mit Hilfe der  
Doppelantikörper-Trenntechnik.



18.12.80  
20.1 Beispiel 12

5 Verwendung von Homopolyglycidylmethacrylat-Latexpartikeln  
als Träger für Anti-T<sub>4</sub>-Serum vom Schaf; diagnostisches  
Mittel zur Durchführung eines T<sub>4</sub>-ELISA

---

10 Für die Bestimmung von Thyroxin (T<sub>4</sub>) mittels ELISA wurden  
zunächst T<sub>4</sub>-Antikörper aus einem Anti-T<sub>4</sub>-Serum vom Schaf  
an die erfindungsgemäßen hydrophilen Homopolyglycidyl-  
methacrylat-Latexpartikel kovalent gebunden, indem letztere  
nach einem der Beispiele 7-9 derivatisiert und in Analogie  
zu den Beispielen 10 und 11 mit den T<sub>4</sub>-Antikörpern umge-  
setzt werden. Die so erhaltenen solid-face-Antikörper  
stellen das erste Reagens für den Test dar. Als zweites  
15 Reagens wird T<sub>4</sub> in an sich bekannter Weise mit einem hier-  
für geeigneten Enzym, beispielsweise Peroxidase (POD) oder  
β-Galaktosidase (β-Gal), markiert, d.h. zu einem Enzym-  
konjugat "gekoppelt". Als Enzym wird im vorliegenden Bei-  
spiel β-Gal verwendet. Das dritte Reagens ist die einen  
20 unbekannten Gehalt an T<sub>4</sub> aufweisende Probe und das vierte  
Reagens ein übliches Substrat für die β-Gal des Enzym-  
konjugats, und zwar im vorliegenden Falle Nitrophenyl-β-  
galactosid in Tris-HCl-Puffer, pH 7.3.

25 Das Testprinzip beruht auf dem Ablauf folgender drei  
Reaktionen:

1. Der immunologischen Reaktion zwischen den an die  
hydrophilen Latexpartikel kovalent gebundenen T<sub>4</sub>-  
30 Antikörpern einerseits und dem enzymmarkierten T<sub>4</sub>  
("Enzymkonjugat") und dem in der Probe enthaltenen  
freien T<sub>4</sub> andererseits. Bei dieser Reaktion findet  
also eine kompetitive Bindung zwischen den solid-  
face-Antikörpern, dem Enzymkonjugat und dem T<sub>4</sub> der  
35 Probe statt.

17. 10. 80  
27.

- 1     2. Der B/F-Trennung (B=bound, F=free). Es handelt sich  
      hier also um eine Trennung von gebundenem (bound)  
      und ungebundenem (free) Enzymkonjugat. Diese Trennung  
      kann in vorteilhafter Weise durch Zentrifugieren oder  
 5     durch Dialyse, beispielsweise gegen Wasser oder eine  
      geeignete Pufferlösung, erreicht werden.
  
3. Der Enzymnachweisreaktion, die zwischen dem Enzym-  
      konjugat und dem üblicherweise verwendeten, für das  
 10     eingesetzte Enzym spezifischen, Substrat abläuft und  
      die kolorimetrisch oder auf andere bekannte Weise ver-  
      folgt werden kann. Die Enzymaktivität kann entweder  
      im Zentrifugat (free-Anteil) oder in dem resuspendierten  
      Niederschlag (bound-Anteil) erfolgen.

15

#### Versuchsdurchführung

Die in oben angegebener Weise hergestellte Latex-anti-T<sub>4</sub>-  
 Suspension wird im Wasser oder Pufferlösung im Verhältnis  
 20     1:1000 verdünnt. 0,5 ml dieser Suspension werden mit 100 µl  
      einer T<sub>4</sub>-Serum-Standardlösung mit verschiedenem, jeweils  
      bekanntem T<sub>4</sub>-Gehalt und 100 µl einer T<sub>4</sub>-β-Gal-Konjugat-  
      Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 30 Minuten  
      bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation  
 25     wurde ein Ansatz ständig geschüttelt, während ein zweiter  
      Ansatz mit gleichem T<sub>4</sub>-Standardgehalt lediglich stehen  
      gelassen wurde. Danach wurde jeweils die Suspension zen-  
      trifugiert und der Überstand, in dem sich die F-Phase  
      befindet, abgetrennt. Die B-Phase, also das an die solid-  
 30     face-Antikörper gebundene T<sub>4</sub>-β-Gal-Konjugat, befindet  
      sich im Niederschlag. Zur Bestimmung der Enzymaktivität  
      wird dieser in überschüssiger Substrat-Lösung, bestehend  
      aus

- 35     450 mg/l p-Nitrophenyl-β-galactosid (Fa. Sigma)
- 100 mM Natriumchlorid
- 10 mM Magnesiumchlorid
- 10 mM Tris-Puffer/HCl
- 0,4 % (V/V) Mercaptoäthanol
- pH-Wert 7.3

18. 12. 80  
22.

- 1 versetzt und in bekannter Weise die Extinktion bei  
einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Es zeigte sich,  
daß die ohne äußere mechanische Durchmischung in der  
Schwebe gehaltenen Latexpartikel ein um etwa 11 %  
5 verringertes Signal ergeben.

- Nachdem auf diese Weise die  $T_4$ -Eichkurven ermittelt wur-  
den, wurden anschließend in derselben Weise Bestimmungen  
10 durchgeführt, bei denen anstelle von 100  $\mu$ l  $T_4$ -Standard-  
serum jeweils 100  $\mu$ l von Proben unbekannten  $T_4$ -Gehalts  
eingesetzt und die Extinktion der B-Phasen nach der  
Resuspendierung in Substratlösung gemessen werden.

- 15 Es wurde festgestellt, daß die hydrophilen Latexpartikel  
als Träger für Antikörper und auch Antigene hervorragend  
geeignet sind und deren Immunreaktivität nicht beein-  
trächtigen. Sie können daher mit großem Vorteil bei solid-  
20 face-Enzymimmuntesten als Träger eingesetzt werden. Weiter  
wurde festgestellt, daß die hydrophilen Latexpartikel in  
Puffermilieu über lange Zeit hinweg in der Schwebe bleiben,  
daß die Dichte der Partikel also etwa gleich eins ist.  
Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen hydrophilen  
25 Latexpartikel gut zentrifugierbar und resuspendierbar,  
ohne an Immunreaktivität einzubüßen.

#### Beispiel 13

- 30 Enzymimmunoassay (EIA) zur Bestimmung von Human-  
Thyreotropin (TSH)
- 

- Die Bestimmung von TSH in Humanserum ist von erheblicher  
Bedeutung für die Diagnose von Schilddrüsenerkrankungen.  
35 Eine primäre Hypothyreose erkennt man an einer stark  
erhöhten Basal-TSH-Konzentration (10 bis 100  $\mu$ U TSH/ml).  
Darüber hinaus kann eine Hyperthyreose mit Sicherheit  
dann ausgeschlossen werden, wenn der TSH-Basalwert im

19. 12. 80  
23.

- 1 Serum von 0,5 bis 3  $\mu$ U/ml nach Stimulation mit TRH  
(Thyroidea-releasing-hormon) nicht ansteigt. Steigt der  
TSH-Wert dagegen um mindestens 2,5  $\mu$ U/ml, jedoch um nicht  
mehr als 25  $\mu$ U/ml, dann ist der Schilddrüsen-Stoffwechsel  
5 mit hoher Wahrscheinlichkeit ungestört. Ein Anstieg um  
mehr als 25  $\mu$ U/ml von einem mehr oder weniger leicht er-  
höhten Basalwert läßt auf eine latente präklinische  
Hypothyreose schließen. Es sind bereits Enzymimmunoassays  
für TSH bekannt (Clinica Chemica Acta 67, 263 - 268 (1976);  
10 enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs,  
herausgegeben von S.B. Pal, Walter de Gruyter, Berlin und  
New York, 1978, S. 327 - 337; Analytical Biochemistry 96,  
419 - 425 (1979)). Diese bekannten Bestimmungsmethoden  
benötigen jedoch übermäßig lange Inkubationszeiten (bis  
15 zu 5 Tage), sind unempfindlich (5  $\mu$ U TSH/ml) oder setzen  
aufwendige Meßgeräte voraus (Fluorometer oder Lumino-  
meter), wobei außerdem eine Vorrichtung zum Mischen der  
Ansätze erforderlich ist.
- 20 Die Verwendung der erfindungsgemäßen hydrophilen Latex-  
partikel ermöglicht nun eine photometrische Bestimmung  
des TSH in einer Gesamtinkubationszeit von nur 2 1/2  
Tagen nach der Doppelantikörper-Trenntechnik. Dabei wird  
der zweite Antikörper an die erfindungsgemäßen hydro-  
25 philen Latexpartikel kovalent gebunden. Die gebundene  
Enzymaktivität wird dann nach einer B/F-Trennung gemessen.
- 30 Da die Latexpartikel eine Dichte aufweisen, die nicht  
wesentlich höher als diejenige von Wasser ist, bleiben  
sie auch während der Enzymreaktion in der Schwebe, wo-  
durch das übliche Mischen entfällt. Bei Verwendung von  
sehr verdünnten Latexsuspensionen, die aufgrund der hohen  
Beladbarkeit mit Antikörpern ohne weiteres möglich ist,  
entfällt auch das Zentrifugieren der Partikel nach Ablauf  
der Enzymreaktion, da durch die Suspension hindurch  
35 photometrisch gemessen werden kann.

20  
24.

1 Im Gegensatz zu den üblicherweise in immunologischen  
Testverfahren verwendeten Latices lassen sich die anti-  
körperbeladenen, erfindungsgemäßen hydrophilen Polyglycidyl-  
methacrylatpartikel nach dem Zentrifugieren leicht re-  
5 suspendieren. Aus demselben Grund zeigt sich eine sehr  
geringe nichtspezifische Adsorption des enzymmarkierten  
Antigens (gebundene Aktivität in Abwesenheit vom primären  
Antikörper).

#### 10 Versuchsdurchführung

0,2 ml TSH-Standard (internationales Referenzpräparat  
MRC 68/38 in TSH-freiem Serum) werden mit 0,1 ml einer  
1:150000 Verdünnung in Wasser oder geeigneter Puffer-  
15 lösung eines an sich bekannten Anti-TSH-Antiserums, bei-  
spielsweise von Meerschweinchen, inkubiert. Nach 12 Stunden  
werden 0,1 ml einer Lösung eines Enzymkonjugats, bestehend  
aus an Glukoseoxidase (GOD) kovalent gekoppeltem TSH (ent-  
sprechend ca.  $1,5 \times 10^{-9}$  g TSH), zu dem Gemisch der ersten  
20 Stufe pipettiert. Zu diesem Gemisch werden nach weiteren  
12 Stunden 0,1 ml einer Latexsuspension pipettiert. Die  
Suspension enthält 0,1 bis 1 mg/ml Methacrylatlatex, wo-  
bei - wie in Beispiel 11 beschrieben - pro 1000 mg der  
trockenen Latexpartikel 5 bis 150 mg Protein einer Immun-  
25 globulinfraktion, die aus einem Ziegenantiserum gegen  
Meerschweinchen-IgG gewonnen wurde, hinzugefügt und so an  
die hydrophilen Latexpartikel kovalent gebunden worden  
sind. Nach einer Stunde wird zentrifugiert und der Nieder-  
schlag der Latexpartikel mit 1 ml einer geeigneten Puffer-  
30 lösung gewaschen, wodurch die Latexpartikel resuspendiert  
werden. Anschließend wird erneut mehrfach zentrifugiert  
und gewaschen. Die Überstände werden verworfen.

35

ORIGINAL INSPECTED



20.10.80  
25.

1 Zu jedem Ansatz wird 1 ml einer Substratlösung für die  
GOD pipettiert und kurz geschüttelt. Die Latexpartikel  
bleiben danach mindestens 2 Stunden lang gleichmäßig  
suspendiert. Danach wird die Suspension in eine Meß-  
5 küvette überführt und die Extinktion bei 405 nm gemessen.  
Von jeder Extinktion wird ein Substratleerwert  $L_1$  abge-  
zogen.  $L_1$  ist die Extinktion von 1 ml Substratlösung,  
die die gleiche Masse beladener Latexpartikel enthält  
wie die oben erwähnte Latex-Suspension, die zu dem Ge-  
10 misch aus Anti-TSH-Antiserum und TSH-GOD zugegeben  
wurde.

Die so ermittelten Extinktionen werden für verschiedene  
Standardkonzentrationen an TSH aufgezeichnet. Mit Hilfe  
15 dieser Eichkurven werden die Konzentrationen von TSH  
in klinischen Proben unbekannten Gehaltes anhand der er-  
mittelten Extinktionen abgelesen.

Als geeignete Pufferlösung wird vorzugsweise eine 0,04 M  
20 Phosphat-Lösung, pH 7,4, verwendet, die 0,005 M EDTA,  
0,1 % Rinderserumalbumin sowie 0,15 M NaCl enthält.

Als GOD-Substratlösung wird bevorzugt eine wäßrige  
Lösung eingesetzt, die 5 g/100 ml Glukose, 100 mg/100 ml  
25 2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolon-sulfonsäure(6)]  
(ABTS), 5 mg/100 ml Peroxidase (POD), 0,05 M Phosphat-  
puffer, pH 5,6, enthält.

Zum Vergleich wurde der TSH-Gehalt dreier Serumproben  
30 sowohl mit dem vorstehend beschriebenen EIA (A) als auch  
mit Hilfe eines bekannten Doppelantikörper-RIA (B) be-  
stimmt. Wie die folgende Tabelle zeigt, stimmen die je-  
weils ermittelten Werte gut überein:

35



22 20.10.80  
26

1	(A)	(B)	
	Serum 1	11,2 $\mu\text{U/ml}$	12,5 $\mu\text{U/ml}$
5	Serum 2	7,3 $\mu\text{U/ml}$	7,1 $\mu\text{U/ml}$
	Serum 3	3,8 $\mu\text{U/ml}$	4,5 $\mu\text{U/ml}$

- 10 Auch aus der vorstehend beschriebenen TSH-Bestimmung ergibt sich, daß die erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel als Träger für biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen, insbesondere für Antikörper hervorragend geeignet sind.

15

#### Ermittlung der unspezifischen Bindung

- 20 Eine TSH-Standard-Probe wird in der oben unter "Versuchsdurchführung" beschriebenen Weise behandelt (Probe C) und mit einer weiteren gleichartigen Probe (Probe D) verglichen, die nahezu den identischen Umsetzungen wie Probe C unterworfen worden ist. Es wurde lediglich das Anti-TSH-Antiserum weggelassen. Der Vergleich der für die beiden Proben C und D in der Suspension gemessenen Extinktionen

25

	Probe C	Probe D
Extinktion gemessen in der Suspension abzüglich $L_1$	1,028	0,015

30

zeigt, daß die unspezifische Bindung weniger als 1,5 % beträgt.

35

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**